

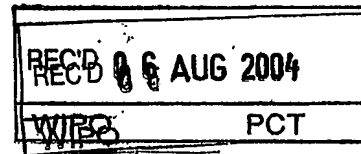
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

18.06.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   6 月 2 0 日  
Date of Application:



出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 1 7 7 0 2 1  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 1 7 7 0 2 1 ]

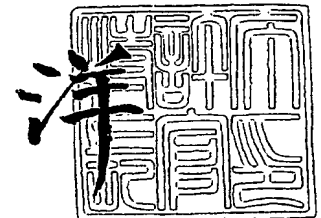
出 願 人            株式会社ジェノメンブレン  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   7 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 2003P1518  
【提出日】 平成15年 6月20日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/15

## 【発明者】

【住所又は居所】 千葉県柏市あけぼの 1 - 8 - 1 8 - 2 0 2

【氏名】 玉井 郁巳

## 【発明者】

【住所又は居所】 千葉県流山市東深井 4 0 0 - 3 サンプルレジオ B 2 0  
1

【氏名】 野沢 敬

## 【特許出願人】

【識別番号】 502133066

【氏名又は名称】 株式会社メディシナル・ゲノミクス

## 【代理人】

【識別番号】 100107984

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100102255

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 誠次

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100118957

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 岡 晴子

【選任した代理人】

【識別番号】 100123168

【弁理士】

【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子

【選任した代理人】

【識別番号】 100120086

【弁理士】

【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 乳癌治療剤のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞を培養し、エストロン 3 硫酸の培養細胞内への取り込みを被検物質存在下において測定し、被検物質による細胞内へのエストロン 3 硫酸の取り込み活性の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 2】 細胞内のエストロン 3 硫酸濃度を測定・評価することにより、トランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 1 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 3】 細胞増殖の程度を測定・評価することにより、トランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 1 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 4】 エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から単離した細胞膜画分に、エストロン 3 硫酸と被検物質とを接触させ、被検物質によるエストロン 3 硫酸の細胞膜画分への特異的結合の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 5】 エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から細胞膜画分を単離し、該細胞膜画分から小胞を作製して単離細胞膜小胞とし、該単離細胞膜小胞にエストロン 3 硫酸と被検物質とを接触させ、被検物質による小胞内へのエストロン 3 硫酸の取込み量もしくは取込み量の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 6】 エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞が、ヒト乳癌培養細胞株であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 7】 ヒト乳癌培養細胞株が、MCF-7 細胞株又は MCF-7 細胞株由来の細胞株であることを特徴とする請求項 6 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 8】 被検物質として、有機アニオントランスポーターの阻害剤で

あり、かつ、嵩高いアニオン性化合物を用いることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 9】 有機アニオントランスポーターの阻害剤であり、かつ、嵩高いアニオン性化合物が、ブロモスルフォフタレイン、ベンズプロマロン、DIDS、プロベネシド、スルフィンピラゾン、ビリルビン、スタチン系HMGCoA還元酵素阻害剤、キニジン、キニーネ、ジゴキシン、胆汁酸類、甲状腺ホルモン(T3, T4)、合成オリゴペプチド類であることを特徴とする請求項 8 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 10】 被検物質として、エストロン 3 硫酸トランスポーターに対する中和抗体を用いることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 11】 エストロン 3 硫酸トランスポーターに対する中和抗体が、SLCトランスポーター、OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTCP, MRPs, BCRPに対する特異抗体であることを特徴とする請求項 10 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 12】 エストロン 3 硫酸トランスポーターが、SLCトランスポーター、OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTCP, MRPs, BCRPから選ばれることを特徴とする請求項 1～11 のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 13】 請求項 1～12 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる乳癌治療剤。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、エストロン 3 硫酸 (エストロン-3-サルフェート; estrone-3-sulfate) トランスポーターのトランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

細胞内外の物質輸送を行う膜タンパク質等はトランスポーターと呼ばれ、脂質二重膜中に埋め込まれているトランスポーターに特定の分子が結合すると、コンフォメーションが変化して物質が取込みあるいは排出輸送されることが知られている。近年、かかるトランスポーター、例えば有機アニオン性物質を輸送するOAT1等の有機アニオントランスポーター、有機カチオン性物質を輸送するOCT1等の有機カチオントランスポーター、ペプチド性物質を輸送するPEPT1等のペプチドトランスポーターなどの遺伝子が相次いで単離・同定されている。これらトランスポーター遺伝子は、全身の正常組織・臓器に偏在しているものもあるが、腎臓、肝臓、脳などといった特定の組織・臓器に局在するものも知られている。

## 【0003】

一方、エストロゲンは雌性動物に発情現象を起こす、いわゆる女性ホルモンであり、天然に存在するエストロン ( $E_1$ )、エストラジオール ( $E_2$ )、エストリオール ( $E_3$ )、エステトロール ( $E_4$ ) と、それらと同様の生物活性を有する合成エストロゲンに分類される。スチルベステロールなどの合成型の一部を除いて、エストロゲンはステロイド構造を有する。エストロン  $0.1 \mu g$  のもつ生物学的作用を1IU (国際単位) とし、これがエストロゲンの単位として用いられている。分泌源は主として卵巣の卵胞及び黄体であるが、妊娠時の胎児胎盤系、副腎、精巣などからも分泌される。卵巣からのエストロゲンの分泌は、下垂体前葉より分泌される性腺刺激ホルモンにより支配される (下行性調節) が、逆にエストロゲンによる間脳下垂体系へのフィードバック作用も認められ (上行性調節)、両者の相互関係により性周期が成立するといわれている。

## 【0004】

さらに、エストロゲンはその受容体 (レセプター) を介して作用し、エストロゲンの作用は標的組織である間脳-下垂体前葉-性器及び乳腺のみならず全身に及び、主な生理作用は、子宮内膜の増殖、子宮筋の発育、第二性徴の発現、月経周期の成立の媒介、妊娠時の母体変化の惹起、乳腺管の増殖分泌促進などであ

る。エストロゲンは主として肝臓において代謝を受け、エストロン 3 硫酸等の抱合型エストロゲンとなり尿中に排泄される。臨床的には、無月経や月経異常の治療、月経の人為的移動、更年期障害、前立腺癌や乳癌に対するホルモン療法、骨粗鬆症などに対して用いられている。

#### 【0005】

乳癌は、発癌時点からエストロゲン受容体システムの異常作動があり、初期はエストロゲン依存性の増殖を続けるが、次第にこの制御を離れた増殖となる。このことから、乳癌の発生と進展にエストロゲンとその受容体が深く関与していると考えられているが、その機序は未だ明らかではない。乳癌は乳腺の上皮組織の末梢乳管や腺房上皮から発生する悪性腫瘍で、欧米では女性の癌死亡の第一位である。わが国での発生頻度はかなり低いが、近年の食生活の欧米化、生活様式の変化などに伴い乳がんによる死亡率は上昇傾向にある。好発年齢は40歳代で、リスク因子として、乳癌の既往・家族歴、未婚、高齢初産、早期初潮と晩期閉経、肥満、放射線被爆、高脂肪食、良性乳腺疾患の既往などを挙げることができる。リンパ節転移は腋窩、鎖骨下、胸骨傍に頻度が高く、転移個数は予後と関連する。血行性転移は骨、肺、肝に多い。主症状は乳房腫瘤であり、表面不整、硬、境界不明瞭で可動性が少ない。乳癌細胞におけるエストロゲンとその受容体との結合によるシグナル伝達をアップストリームにブロックする乳癌細胞の増殖阻害については、図1に示されるように、以下の方法（ブロック1～4）が知られている。

#### 【0006】

ブロック1（アンドロゲンからのエストロゲンの合成阻害）

ファドロゾール：閉経後、エストロゲン合成の律速酵素として働くアロマトラーゼを選択的に阻害して、アンドロゲンからエストロゲンへの変換を妨げることで、生体内のエストロゲン濃度を低下させ、乳ガンの増殖を抑制する。

#### 【0007】

ブロック2（エストロゲンレセプターでの競合阻害）

タモキシフェン、トレミフェン：乳ガン組織などのエストロゲン受容体に対し、エストロゲンと競合的に阻害し、抗エストロゲン作用を示すことによって抗乳

ガン作用を発揮する。

#### 【0008】

ブロック 3 (エストロン硫酸からのエストロゲン合成阻害)

抱合型エストロゲンは細胞内でエストロゲンサルファターゼによって活性型となり、ガン細胞増殖を促進する。この脱抱合酵素を阻害する。

#### 【0009】

ブロック 4 (膜タンパクに対する抗体を利用した細胞障害作用)

ハーセプチン: 乳ガン細胞にはHER2タンパクが高発現するものがある。このHER2と抗体の結合を利用し、抗体依存性細胞障害作用による抗腫瘍効果を発揮する。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

乳癌細胞の増殖阻害における、上記ブロック 1～4の方法では、アロマターゼ阻害剤やエストロゲンサルファターゼ阻害剤、あるいは、タモキシフェンやトレミフェン等のエストロゲン競合阻害剤が乳癌細胞内に取り込まれないと抗腫瘍効果が発揮されないことからドラッグデリバリーの面で、また、細胞内に取り込まれると副作用の面で、それぞれ問題がないとはいえない。本発明の課題は、細胞内に取り込まれる必要がなく、ドラッグデリバリー性に優れ、副作用がきわめて少ない乳癌治療剤のスクリーニング方法を提供することにある。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、乳癌細胞の増殖阻害の方法として、以下のブロック 5 (図 1 参照) について検討した。

ブロック 5 (トランスポーター活性の阻害)

エストロゲン感受性の乳ガン細胞に対し、エストロゲンの供給源であるエストロン 3 硫酸の細胞内取込みを阻害することで抗腫瘍効果が現れる。

#### 【0012】

そして、ヒト乳癌培養細胞MCF-7細胞株をエストロン 3 硫酸と、被検物質としてのブロモスルフォフタレイン (Bromosulphophthalin; BSP) の存在下に



培養した時、細胞表面に発現するエストロン 3 硫酸トランスポーターを介してのエストロン 3 硫酸の細胞内への取込みが阻害され、MCF-7 細胞株の増殖が抑制されることを見出し、本発明を完成するに至った。

### 【0013】

すなわち本発明は、エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞を培養し、エストロン 3 硫酸の培養細胞内への取り込みを被検物質存在下において測定し、被検物質による細胞内へのエストロン 3 硫酸の取り込み活性の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 1）や、細胞内のエストロン 3 硫酸濃度を測定・評価することにより、トランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 1 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 2）や、細胞増殖の程度を測定・評価することにより、トランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価することとして特徴とする請求項 1 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 3）や、エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から単離した細胞膜画分に、エストロン 3 硫酸と被検物質とを接触させ、被検物質によるエストロン 3 硫酸の細胞膜画分への特異的結合の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 4）や、エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から細胞膜画分を単離し、該細胞膜画分から小胞を作製して単離細胞膜小胞とし、該単離細胞膜小胞にエストロン 3 硫酸と被検物質とを接触させ、被検物質による小胞内へのエストロン 3 硫酸の取込み量もしくは取込み量の阻害の程度を測定・評価することを特徴とする乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 5）や、エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞が、ヒト乳癌培養細胞株であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 6）や、ヒト乳癌培養細胞株が、MCF-7 細胞株又は MCF-7 細胞株由来の細胞株であることを特徴とする請求項 6 記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 7）や、被検物質として、有機アニオントランスポーターの阻害剤であり、かつ、嵩高いアニオン性化合物を用いることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法（請求項 8）や、有機アニオントランスポーター

の阻害剤であり、かつ、嵩高いアニオン性化合物が、ブロモスルフォフタレイン、ベンズブロマロン、DIDS、プロベネシド、スルフィンピラゾン、ビリルビン、スタチン系HMG CoA還元酵素阻害剤、キニジン、キニーネ、ジゴキシン、胆汁酸類、甲状腺ホルモン(T3, T4)、合成オリゴペプチド類であることを特徴とする請求項8記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法(請求項9)や、被検物質として、エストロン3硫酸トランスポーターに対する中和抗体を用いることを特徴とする請求項1~7のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法(請求項10)や、エストロン3硫酸トランスポーターに対する中和抗体が、SLCトランスポーター、OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTCP, MRPs, BCRPに対する特異抗体であることを特徴とする請求項10記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法(請求項11)や、エストロン3硫酸トランスポーターが、SLCトランスポーター、OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTCP, MRPs, BCRPから選ばれることを特徴とする請求項1~11のいずれか記載の乳癌治療剤のスクリーニング方法(請求項12)や、請求項1~12のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる乳癌治療剤(請求項13)に関する。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の乳癌治療剤のスクリーニング方法としては、エストロン3硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞を培養し、エストロン3硫酸の培養した細胞内への取り込みを被検物質存在下において測定し、被検物質による細胞内へのエストロン3硫酸のトランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価する方法や、エストロン3硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から単離した細胞膜画分に、エストロン3硫酸と被検物質とを接触させ、被検物質によるエストロン3硫酸の細胞膜画分への特異的結合の阻害の程度を測定・評価する方法や、エストロン3硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から細胞膜画分を単離し、該細胞膜画分から小胞を作製して単離細胞膜小胞とし、該単離細胞膜小

胞にエストロン 3 硫酸と被検物質とを接触させ、被検物質による小胞内へのエストロン 3 硫酸の取込み量もしくは取込み量の阻害の程度を測定・評価する方法であれば特に制限されるものではなく、上記エストロン 3 硫酸と被検物質との共存下の細胞の培養は、使用細胞の増殖用培地を用い、通常の細胞培養条件下、（被検物質非存在下の場合に）少なくとも細胞増殖が有意に認められるまで行うことが望ましく、上記エストロン 3 硫酸と被検物質との細胞膜画分との接触や、上記エストロン 3 硫酸と被検物質との単離細胞膜小胞との接触は、使用細胞の増殖用培地や適当な緩衝液中でインキュベーションすることにより行うことができる。

#### 【0015】

上記被検物質による細胞内へのエストロン 3 硫酸のトランスポーター活性の阻害の程度を測定・評価する方法としては、細胞内のエストロン 3 硫酸濃度を測定・評価する方法や、細胞増殖の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。後述する MCF-7 細胞株, KPL-1, MKL-F 又はそれら細胞株由来の細胞株等のヒト乳癌培養細胞株を用いる場合は、細胞内の被検物質濃度を測定・評価する方法と、細胞増殖の程度を測定・評価する方法とを利用することができるが、エストロン 3 硫酸トランスポーターを発現する形質転換細胞を用いる場合は、細胞内の被検物質濃度を測定・評価する方法を利用することができる。また、エストロン 3 硫酸トランスポーター遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞等に発現させ、2本の微小電極を用いて、トランスポーターを介した基質輸送に伴って生じる膜電位の変化を検出（電流を測定）する電気生理学的方法により測定・評価することもできる。

#### 【0016】

エストロン 3 硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞から細胞膜画分を単離する方法としては、F. Pietri-Rouxelら (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997) の方法など、従来公知の方法を用いることができ、また、細胞膜画分から小胞を作製して単離細胞膜小胞とする方法としては、J.E. Leverら (J. Biol. Chem., 252, 1990-1997 (1977)) の方法など、従来公知の方法を用いることができる。そしてまた、被検物質によるエストロン 3 硫酸の細胞膜画分への特異的結合の阻害の程度を測定する方法としては、放射性標識エストロン 3 硫酸を

用いた定常状態結合阻害から平衡解離定数KDを測定する方法を例示することができ、被検物質による単離細胞膜小胞内へのエストロン3硫酸の取込み量もしくは取込み量の阻害の程度を測定する方法としては、I. Tamaiら (Biochim. Biophys. Acta, 1512, 273-284 (2001)) 記載の方法など、従来公知の手法を細胞内エストロン3硫酸の測定方法として用いることができる。

#### 【0017】

上記エストロン3硫酸トランスポーターとしては、SLCトランスポーター、OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTC P, MRPs, BCRPを候補トランスポーターとして好適に挙げることができる。

#### 【0018】

上記エストロン3硫酸トランスポーターを細胞表面に発現する細胞としては、MCF-7細胞株, KPL-1, MKL-F又はそれら細胞株由来の細胞株等のヒト乳癌培養細胞株を好適に用いることができる。これらヒト乳癌培養細胞株の他、エストロン3硫酸トランスポーターを発現する形質転換細胞も使用することができる。かかる形質転換細胞の作製に使用される前記SLCトランスポーター, OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTC P, MRPs, BCRPをコードする遺伝子の由来としては特に制限されるものではなく、例えばヒト, イヌ, ウシ, ウマ, ヤギ, ヒツジ, サル, ブタ, ウサギ, ラット, マウス等を挙げることができるが、ヒト由来が好ましい。

#### 【0019】

上記のようなトランスポーターををコードする遺伝子やcDNAを細胞に発現させる方法としては特に限定されないが、Davisら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及びSambrookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション, DEAE-デキストラン媒介トランスフ

エクシオン, トランスベクション (transvection) マイクロインジェクション, カチオン性脂質媒介トランスフェクション, エレクトロポレーション, 形質導入, スクレープローディング (scrape loading), 弾丸導入 (ballistic introduction), 感染等の遺伝子導入法により、トランスポーター遺伝子を宿主細胞へ導入することにより発現させることができるが、トランスポーター遺伝子を含む発現ベクターを上記宿主細胞に導入することが好ましく、中でもトランスポーター遺伝子を含む発現ベクターを宿主細胞に感染させることにより、トランスポーターを細胞に発現させることがより好ましい。

### 【0020】

上記発現ベクターとしては、例えば、非分裂細胞を含む全ての細胞（血球系以外）での一過性発現に用いられるアデノウイルスベクター (Science, 252, 431-434, 1991) や、分裂細胞での長期発現に用いられるレトロウイルスベクター (Microbiology and Immunology, 158, 1-23, 1992) や、非病原性、非分裂細胞にも導入可能で、長期発現に用いられるアデノ随伴ウイルスベクター (Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 97-129, 1992)、SV40のようなパポバウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等のウイルスベクターの他、リボソーム等を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。これらの中でも、高い効率で細胞における遺伝子発現が可能なアデノウイルスベクターが特に好ましい。また、これらの発現ベクターへのトランスポーター遺伝子の導入は常法によって行うことができ、例えばこれら発現ベクター中の適当なプロモーターの下流にトランスポーター遺伝子等を挿入することにより発現ベクターを構築することができる。また、発現ベクターはトランスポーター遺伝子及びマーカー遺伝子に加え、トランスポーターの細胞当たりの発現量を規格化するためのIRES (mRNA内部のリボソーム結合サイト) の他、エンハンサー、ターミネーター等発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

### 【0021】

トランスポーターを発現する宿主細胞としては、ドロソフィラS2, スポドプテラSf9等の昆虫細胞, Ver o細胞, HeLa細胞, CHO細胞, WI-38細胞, BHK細胞, COS-7細胞, MDCK細胞, C127細胞, HKG細胞

胞, ヒト腎細胞株, CV-1細胞, LLC-MK2細胞, MDBK細胞, MRC-5細胞, Caco-2細胞, HT29細胞, ヒトリンパ芽球細胞, アフリカツメガエル等の卵母細胞や、これらの dhfr 欠損株, HGPRT 欠損株, ウアバイン耐性株等を挙げることができる。具体的には、CHO-K1 (チャイニーズハムスター卵巣細胞: ATCC CCL61), BHK (ハムスター腎細胞: ATCC CCL10), COS-7 (CV-1 Origin, SV-40細胞: ATCC CRL1651), Vero細胞 (アフリカミドリザル腎細胞: ATCC CCL81), ヒトリンパ芽球細胞 (IM-9, ATCC CCL159) を例示することができる。

#### 【0022】

上記被検物質として、有機アニオントランスポーターの阻害剤であり、かつ、嵩高いアニオン性化合物を乳癌治療剤の候補化合物として好適に例示することができる。より具体的には、プロモスルフォフタレイン, ベンズブロマロン (Benzbromarone), DIDS, プロベネシド (Probenecid), スルフィンピラゾン (Sulfinpyrazone), ビリルビン (Bilirubin), スタチン (statin) 系 HMG Co A (3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 還元酵素阻害剤 (例えば、プラバスタチンナトリウム, シンバスタチン, フルバスタチンなど), キニジン (Quinidine), キニーネ (Quinine), ジゴキシン (Digoxin), 胆汁酸類 (例えば、Taurocholate, cholate など), 甲状腺ホルモン (T3, T4 など), 合成オリゴペプチド類等を挙げることができる。

#### 【0023】

また、トランスポーターは細胞膜表面に発現する膜タンパク質であるため、エストロン3硫酸トランスポーターに対する中和抗体は細胞外から選択的に標的を阻害する可能性があり、このことから上記被検物質として、エストロン3硫酸トランスポーターに対する中和抗体を乳癌治療剤の候補物質として好適に例示することができる。より具体的には、SLCトランスポーター, OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-F, OATP-8, NTCP, MRPs, BCRP を特異的に認識する抗体を例示することができ、かかる特異的に認識する抗

体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、2つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示することができる。これら抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）にエストロン3硫酸トランスポーターを膜表面に発現している細胞やその細胞膜画分を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。

#### 【0024】

また、一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,455,030号）を用いることができ、ヒト化抗体をつくるために、ヒト化抗体の調製法（米国特許第5,585,089号、Nature, 321, 522-525, 1986、Protein Engineering, 4, 773-783, 1991）を用いることができ、キメラ抗体をつくるために、キメラ抗体の調製法（米国特許第4,816,567号、Science, 229, 1202-1207, 1985、BioTechniques, 4, 214, 1986、Nature, 312, 643-646, 1984、Nature, 314, 268.270, 1985）を用いることができる。二機能性抗体は、2つの関連した抗体を産生する2つのモノクローナル細胞系同士のハイブリッド、または2つの抗体の断片の化学結合によって産生することができ、例えば、エストロン3硫酸トランスポーターと被験ペプチドとに同時に結合しうる二機能性抗体を挙げることができる。

#### 【0025】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

MCF-7細胞（ATCC-HTB22）のエストロン3硫酸による細胞増殖促進効果の抑制が、エストロン3硫酸の細胞内蓄積を抑えることで達成されるか否かを検討した。MCF-7細胞を $8 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>の濃度で96ウェル プ

レートに播種し1日培養した後、 $10\text{ pM}$ ～ $10\text{ }\mu\text{M}$ の各種濃度のエストロン3硫酸 (Sigma Chemicals社製) と $100\text{ }\mu\text{M}$ のプロモスルフォフタレイン (BSP: Sigma Chemicals社製)、及び、 $1\text{ pM}$ ～ $10\text{ nM}$ の各種濃度のエストラジオール (estradiol: Sigma Chemicals社製) と $100\text{ }\mu\text{M}$ のBSPを含む培地をそれぞれ添加し、さらに3日間培養した。その後、細胞量を測定した。エストロン3硫酸及びエストラジオールによる細胞増殖促進効果の結果を図2に示す。

#### 【0026】

図2から明らかなように、ポジティブコントロールであるエストロン3硫酸単独存在下及びエストラジオール単独存在下においては、細胞増殖促進効果が観察された(open column)。一方、エストロン3硫酸又はエストラジオールに、 $100\text{ }\mu\text{M}$ のBSPを同時添加することによって共存下に培養すると、エストロン3硫酸低濃度条件において細胞増殖促進効果が見られるが、これは、BSP自身あるいはその代謝物によるエストロゲン活性であると考えられる。この効果はエストロゲン濃度が増加するに従い、相対的に低くなった。興味深いことに、エストロン3硫酸 $10\text{ }\mu\text{M}$ 添加時、BSPによる細胞増殖効果は阻害されたのに対し、エストラジオール添加による効果には変化しなかった。したがって、エストロン3硫酸の細胞内取込みはBSPにより阻害され、脂溶性の高いエストラジオールは阻害されないため、細胞増殖効果にも変化がなかったと考えられた。以上のことから、細胞増殖におけるエストロン3硫酸の取り込みトランスポーターの重要性が示唆され、そのトランスポーターを阻害することによる細胞増殖抑制の可能性が示された。

#### 【0027】

##### 【発明の効果】

本発明によると、アロマターゼ阻害剤やエストロゲンサルファターゼ阻害剤、タモキシフェンやトレミフェン等のエストロゲン競合阻害剤と異なり、細胞内に取り込まれる必要がなく、ドラッグデリバリー性に優れ、副作用がきわめて少ない乳癌治療剤をスクリーニングすることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】



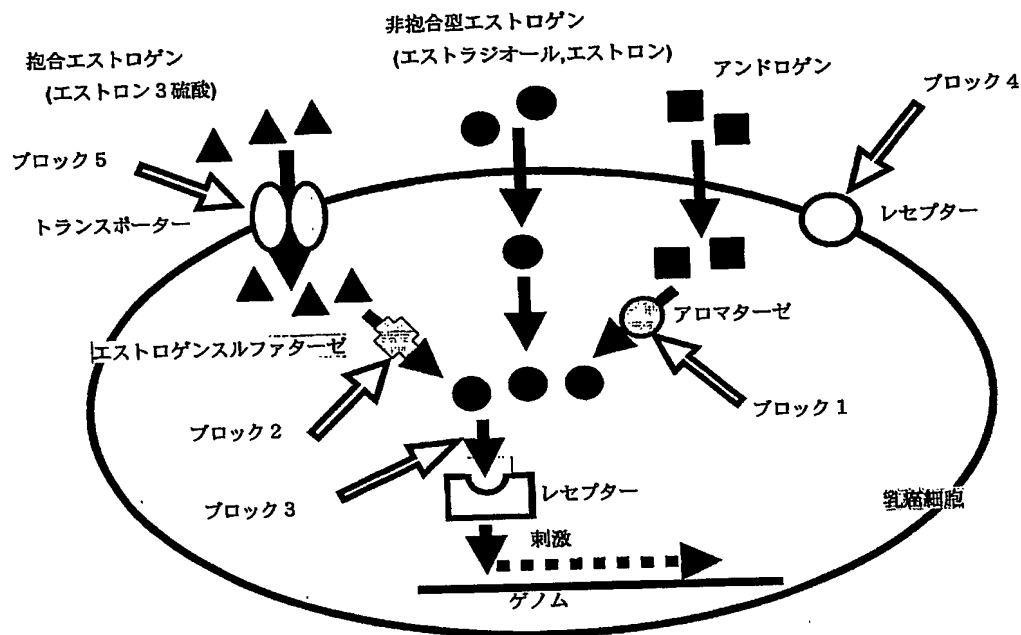
乳癌の分子ターゲットを示す模式図である。

【図 2】

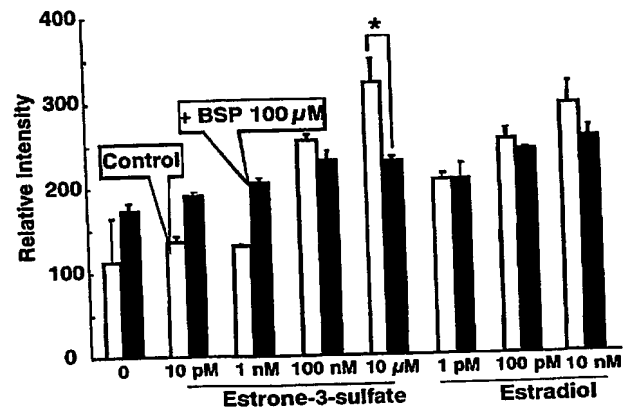
BSP によるエストロン 3 硫酸の乳癌細胞への取込み阻害を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アロマターゼ阻害剤やエストロゲンサルファターゼ阻害剤、タモキシフェンやトレミフェン等のエストロゲン競合阻害剤と異なり、細胞内に取り込まれる必要がなく、ドラッグデリバリー性に優れ、副作用がきわめて少ない乳癌治療剤のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 ヒト乳癌培養細胞MCF-7細胞株をエストロン3硫酸と、プロモスルフォフタレイン等の被検物質としての存在下に培養し、細胞表面に発現するエストロン3硫酸トランスポーターを介してのエストロン3硫酸の細胞内への取込みが阻害され、MCF-7細胞株の増殖が抑制されるかどうかを評価し、トランスポーター機能阻害の乳癌治療剤をスクリーニングする。

## 認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2003-177021  
受付番号 50301036197  
書類名 特許願  
担当官 第一担当上席 0090  
作成日 平成15年 6月23日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 502133066  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市緑区霧が丘四丁目17番地30  
【氏名又は名称】 株式会社メディシナル・ゲノミクス

## 【代理人】

申請人  
【識別番号】 100107984  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100102255  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 小澤 誠次

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100118957  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 岡 晴子

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100123168  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂2丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100120086  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂2丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所

次頁有

認定・付加情報 (続き)

【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也

次頁無

特願 2003-177021

出願人履歴情報

識別番号

[502133066]

1. 変更年月日 2002年 4月12日  
[変更理由] 新規登録  
住所 神奈川県横浜市緑区霧が丘四丁目17番地30  
氏名 株式会社メディシナル・ゲノミクス
2. 変更年月日 2004年 1月 8日  
[変更理由] 名称変更  
住所変更  
住所 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1  
氏名 株式会社ジェノメンブレン